



REC'D 06 SEP 2004  
WIPO PCT

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

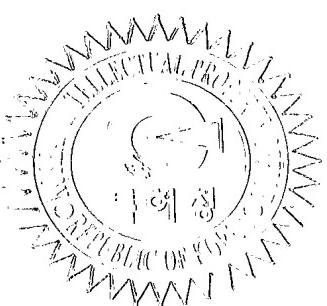
This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원번호 : 10-2004-0006352  
Application Number

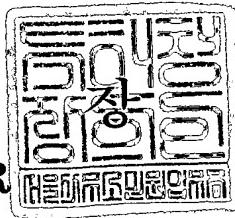
출원년월일 : 2004년 01월 30일  
Date of Application JAN 30, 2004

출원인 : 한국생명공학연구원  
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biof

2004년 07월 22일



특허청  
COMMISSIONER



**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

## 【서지사항】

|            |   |
|------------|---|
| 【서류명】      | 서지사항 보정서  |
| 【수신처】      | 특허청장  |
| 【제출일자】     | 2004.07.06  |
| 【제출인】      |   |
| 【명칭】       | 한국생명공학연구원   |
| 【출원인코드】    | 3-1999-034166-5   |
| 【사건과의 관계】  | 출원인   |
| 【대리인】      |   |
| 【성명】       | 손민  |
| 【대리인코드】    | 9-1999-000420-6   |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-050197-2   |
| 【사건의 표시】   |   |
| 【출원번호】     | 10-2004-0006352   |
| 【출원일자】     | 2004.01.30  |
| 【심사청구일자】   | 2004.04.30  |
| 【발명의 명칭】   | 알파 1,6-만노실트랜스퍼라제를 코딩하는 한세놀라<br>풀리모르파 기원의 신규 유전자 및 상기 유전자가<br>결손된 한세놀라 풀리모르파 변이주를 이용한 재조<br>합 당단백질 생산 방법 |
| 【제출원인】     |   |
| 【접수번호】     | 1-1-2004-0040983-13   |
| 【접수일자】     | 2004.01.30  |
| 【보정할 서류】   | 특허출원서   |
| 【보정할 사항】   |   |
| 【보정대상항목】   | 발명자   |
| 【보정방법】     | 정정  |
| 【보정내용】     |   |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 강현아   |
| 【성명의 영문표기】 | KANG,Hyun Ah  |
| 【주민등록번호】   | 630119-2067015  |
| 【우편번호】     | 305-325   |

|            |   |
|------------|---|
| 【주소】       | 대전광역시 유성구 노은동 열매마을 11단지 1109동<br>502호                       |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 김무웅   |
| 【성명의 영문표기】 | KIM,Moo Woong   |
| 【주민등록번호】   | 740401-2408511  |
| 【우편번호】     | 302-758   |
| 【주소】       | 대전광역시 서구 관저동 원양마을아파트 401동 602<br>호                          |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 이상기   |
| 【성명의 영문표기】 | RHEE,Sang Ki  |
| 【주민등록번호】   | 510605-1010411  |
| 【우편번호】     | 143-210   |
| 【주소】       | 서울특별시 광진구 광장동 극동빌라 가동 10호                                   |
| 【국적】       | KR  |
| 【발명자】      |   |
| 【성명의 국문표기】 | 허주형   |
| 【성명의 영문표기】 | HEO,Joo-Hyung   |
| 【주민등록번호】   | 670317-1051611  |
| 【우편번호】     | 302-283   |
| 【주소】       | 대전광역시 서구 월평3동 301 누리아파트 108동<br>606호                        |
| 【국적】       | KR  |
| 【취지】       | 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 손민 (인) |
| 【수수료】      |   |
| 【보정료】      | 원   |
| 【기타 수수료】   | 0 원   |
| 【합계】       | 0 원   |
| 【첨부서류】     | 1. 기타첨부서류[사유서]_1통   |

## 【서지사항】

|            |  |
|------------|--|
| 【서류명】      | 특허출원서  |
| 【권리구분】     | 특허   |
| 【수신처】      | 특허청장   |
| 【제출일자】     | 2004.01.30   |
| 【발명의 명칭】   | 알파 1,6-만노실트랜스퍼라제를 코딩하는 한세눌라 폴리모르파 기원의 신규 유전자 및 상기 유전자가 결손된 한세눌라 폴리모르파 변이주를 이용한 재조합 당단백질 생산 방법  |
| 【발명의 영문명칭】 | A novel <i>Hansenula polymorpha</i> gene coding for $\alpha$ 1,6-mannosyltransferase and process for the production of recombinant glycoproteins with <i>Hansenula polymorpha</i> mutant strain deficient in the same gene |
| 【출원인】      |  |
| 【명칭】       | 한국생명공학연구원  |
| 【출원인코드】    | 3-1999-034166-5  |
| 【대리인】      |  |
| 【성명】       | 손민   |
| 【대리인코드】    | 9-1999-000420-6  |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-050197-2  |
| 【발명자】      |  |
| 【성명의 국문표기】 | 강현아  |
| 【성명의 영문표기】 | KANG, Hyun Ah  |
| 【주민등록번호】   | 630119-2067015   |
| 【우편번호】     | 305-325  |
| 【주소】       | 대전광역시 유성구 노은동 열매마을 11단지 1109동 502호   |
| 【국적】       | KR   |
| 【발명자】      |  |
| 【성명의 국문표기】 | 김무웅  |
| 【성명의 영문표기】 | KIM, Moo Woong   |
| 【주민등록번호】   | 740401-2408511   |
| 【우편번호】     | 302-758  |
| 【주소】       | 대전광역시 서구 관저동 원양마을아파트 401동 602호   |
| 【국적】       | KR   |

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 이상기  
 【성명의 영문표기】 RHEE, Sang Ki  
 【주민등록번호】 510605-1010411  
 【우편번호】 143-210  
 【주소】 서울특별시 광진구 광장동 극동빌라 가동 10호  
 【국적】 KR

## 【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCTC  
 【수탁번호】 10583BP  
 【수탁일자】 2004.01.15

## 【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCTC  
 【수탁번호】 10584BP  
 【수탁일자】 2004.01.15

## 【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 14  
 【서열목록의 전자파일】 첨부  
 【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 손민 (인)

## 【수수료】

|          |          |   |          |
|----------|----------|---|----------|
| 【기본출원료】  | 45       | 면 | 38,000 원 |
| 【가산출원료】  | 0        | 면 | 0 원      |
| 【우선권주장료】 | 0        | 건 | 0 원      |
| 【심사청구료】  | 0        | 항 | 0 원      |
| 【합계】     | 38,000 원 |   |          |

【감면사유】 정부출연연구기관  
 【감면후 수수료】 19,000 원

【첨부서류】 1. 미생물기탁증명서[국제양식 포함]\_2통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 당외쇄 신장 개시 알파1,6-만노실트랜스퍼라제를 코딩하는 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 신규 유전자, 이러한 유전자가 결손된 한세눌라 폴리모르파 변이주 및 이러한 변이주를 이용하여 재조합 당단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

**【대표도】**

도 5

**【색인어】**

한세눌라 폴리모르파, 알파1,6-만노실트랜스당단백질, 당외쇄, 과당화, 당쇄공학

**【명세서】****【발명의 명칭】**

알파1,6-만노실트랜스퍼라제를 코딩하는 한세눌라 폴리모르파 기원의 신규 유전자 및 상기 유전자가 결손된 한세눌라 폴리모르파 변이주를 이용한 재조합 당단백질 생산 방법{A novel *Hansenula polymorpha* gene coding for a 1,6- mannosyltransferase and process for the production of recombinant glycoproteins with *Hansenula polymorpha* mutant strain deficient in the same gene}

**【도면의 간단한 설명】**

도 1은 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*: *H. polymorpha*) *HpOCH2* 유전자의 염기 서열과 예상하는 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 막통과 부위라 추정되는 부위는 밑줄로 표시하였고 DXD 요소에 해당하는 아미노산 서열은 굵은 글씨와 밑줄로 표시하였다.

도 2는 한세눌라 폴리모르파와 다른 효모 균주들의 Och1 단백질 상동체들의 아미노산 서열을 비교한 것이다. *HpOch2p*, 한세눌라 폴리모르파 Och2 단백질; *HpOch1p*, 한세눌라 폴리모르파 Och1 단백질; *CaOch1p*, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) Och1 단백질; *PpOch1p*, 피시아 파스토리스(*Pichia pastoris*) Och1 단백질; *ScOch1p*, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) Och1 단백질; *SpOch1p*, 쉬조사카로마이세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*) Och1 단백질. 괄호 안에 있는 숫자는 한세눌라 폴리모르파 *HpOch2p*에 대한 다른 효모 균주들의 Och1p 상동체들 사이의 아미노산 서열 동일성을 표시한 것이다.

도 3은 한세눌라 폴리모르파 *HpoCH2* 유전자 파쇄를 유도하기 위한 세포내 유전자 재조합에 관한 도식도를 그린 것이다.

도 4는 한세눌라 폴리모르파 *Hpoch2Δ* 변이주의 성장 특징에 관한 도식이다. 지수기에 있는 한세눌라 폴리모르파 야생형 균주, *Hpoch1Δ* 그리고 *Hpoch2Δ* 결손 균주들의 배양액( $OD_{600}=1$ )을 10 배씩 연속적으로 희석하여 3  $\mu$ l씩 스포팅 한 후 2 일간 배양하였다. A; 37°C에서의 YPD 배지, B; 45°C에서의 YPD 배지, C; 40  $\mu$ g/ml의 하이그로마이신 B(hygromycin B)가 첨가된 YPD 배지, D; 0.4%의 소듐 데옥시콜레이트(sodium deoxycholate)가 첨가된 YPD 배지, E; 7 mg/ml의 칼코플로우 화이트(Calcofluor white)가 첨가된 YPD 배지.

도 5는 한세눌라 폴리모르파 *Hpoch2Δ* 변이주로부터 발현된 글루코우즈 옥시다제(GOD, glucose oxidase)에 부착된 당쇄 크기와 구조 분석에 관한 도식이다. 한세눌라 폴리모르파 야생형 균주와 *Hpoch2Δ* 변이주로부터 발현된 GOD에 부착된 당쇄 프로파일(A 그리고 D); 알파1,2-만노시다제(α 1,2-mannosidase)를 처리한 후의 당쇄 프로파일(B 그리고 E); 연속적으로 알파1,6-만노시다제(α 1,6-mannosidase)를 처리한 후의 당쇄 프로파일 (C 그리고 F)을 HPLC로 분석하였다. 그 크기와 구조를 알고 있는 표준 당쇄의 검출 시간을 화살표로 표시하였다. M5,  $Man_5GlcNAc_2-PA$ ; M6,  $Man_6GlcNAc_2-PA$ ; M8,  $Man_8GlcNAc_2-PA$ ; M11,  $Man_{11}GlcNAc_2-PA$ .

도 6은

*HpOCH2* 유전자 도입에 의한 사카로마이세스 세레비지애 *och1*△ 돌연변이의 기능 보완 실험에 대한 도식이다. 사카로마이세스 세레비지애 야생형 균주(1)와 *och1*△ 돌연변이주(*Scoch1*△)(2)에 컨트롤 벡터인 YE<sub>p</sub>352GAPII를 도입하였다. *Scoch1*△ 돌연변이주에 *HpOCH1* 유전자 발현벡터인 YE<sub>p</sub>352GAPII- *HpOCH1*(3), *HpOCH2* 유전자 발현벡터인 YE<sub>p</sub>352GAPII-*HpOCH2*(4), 그리고 *ScOCH1* 유전자 발현벡터인 YE<sub>p</sub>352GAPII- *ScOCH1*(5)를 각각 도입하였다. 도 6A는 지수기에 있는 효모 배양액(OD<sub>600</sub>=1)을 10 배씩 연속적으로 희석하여 YPD 플레이트에 3 μl씩 스포팅한 후 각각 25°C 와 30°C에서 3 일간 배양하였다. 도 6B는 각각의 균주에서 발현된 인버타제(invertase)의 활성 정도를 활성 염색법으로 알아본 실험이다.

도 7은 *HpOch2* 단백질의 알파1,6-만노실트랜스퍼라제(α 1,6-mannosyltransferase) 활성을 알아보기 위한 실험이다. 컨트롤 벡터인 YE<sub>p</sub>352GAPII(A), *HpOCH2* 유전자 발현 벡터인 YE<sub>p</sub>352GAPII-*HpOCH2*(B) 또는 *ScOCH1* 유전자 발현 벡터인 YE<sub>p</sub>352GAPII-*ScOCH1*(C)들이 각각 도입된 사카로마이세스 세레비지애 *och1*△*mnn1*△*mnn4*△ 돌연변이주로부터 획득한 세포막 샘플에 Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA를 30°C에서 2시간동안 반응시킨 후 그 반응의 결과물을 HPLC로 분석하였다.

도 8은 한세눌라 폴리모르파 균주로부터 발현된 GOD에 부착된 당쇄 크기와 구조의 변화를 HPLC 분석한 도식도이다. 한세눌라 폴리모르파 야생형 균주와 *Hpoch2*△ 결손 균주로부터 분비 발현된 GOD의 당쇄 프로파일(A 그리고 D); 아스페질러스 사이토이(*Aspergillus saitoi*) 유래의 알파1,2-만노시다제를 발현하는 한세눌라 폴리모르파 야생형 균주와 *Hpoch2*△ 결손 균주로부터 발현된 GOD에 부착된 당쇄 프로파일(B 그리고 E); 알파1,2-만노시다제를 외부적으로 처리한 후의 당쇄 프로파일(C 그리고 F)을 HPLC 분석하였다.

도 9는 사카로마이세스 세레비지애와 한세눌라 폴리모르파 Och1 단백질 상동체들 사이의 아미노산 서열 동일성(identity)과 유사성(similarity)을 보여준다.

### 【발명의 상세한 설명】

### 【발명의 목적】

### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <10> 본 발명은 당외쇄 신장 개시 알파1,6-만노실트랜스퍼라제를 코딩하는 한세눌라 폴리모르파 신규 유전자, 이러한 유전자가 결손된 한세눌라 폴리모르파 변이주 및 이러한 변이주를 이용하여 재조합 당단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- <11> 의료용 단백질을 대량 발현하는 경우 숙주세포나 목적 단백질의 특징에 따라서 단백질의 발현량, 수용성 여부, 발현 장소, 수식(modification) 등이 각기 다르므로 목적 단백질에 가장 적합한 발현 시스템을 선택해야만 효율적인 생산 시스템을 구축할 수 있다.
- <12> 대부분의 의료용 단백질은 분비 경로 중에 소포체(Endoplasmic reticulum)와 골지체(Golgi apparatus)를 거치면서 단백질의 아스파라진(asparagine)에 당쇄(oligosaccharide)가 공유결합으로 부착되는 당단백질(glycoprotein)이다(Jenkins et al., Nat. Biotechnol., 14, 975-9, 1996). 당단백질에 부착된 당쇄 구조와 종류가 그 단백질의 폴딩(folding), 생물학적 활성, 혈장내 안정성 등에 큰 영향을 미치므로 원형의 당쇄 형태와 의약적 활성을 지닌 의료용 재조합 당단백질 생산을 위한 접근방법 중 현재까지 동물세포 발현 시스템이 많이 이용되어져 왔다. 하지만 낮은 생산성, 비싼 배지 비용, 레트로바이러스(retrovirus) 감염 위험을 비롯하여 안정된 세포주를 만들기 위해서 소요되는 긴 시간 등은 동물세포 배양을 이용한 재조합 당

단백질 생산의 큰 제한점이 되고 있다. 이러한 동물세포 발현 시스템의 대체 숙주로 진핵생물이며 고등 동물세포의 N-결합형 당화 과정의 초기 단계가 동일한 효모 발현 시스템을 이용하여 의료용 재조합 단단백질 생산을 위한 시도들이 진행되고 있다.

<13>      효모 등의 진핵생물의 경우, 고 농도 단백질을 신속하게 생성하고 멸균되고 잘 조절되는 생성 조건을 이용할 수 있고 유전자 조작이 용이하고 인간 또는 동물 병원체의 감염이 없으며 단백질의 회수가 용이하다는 이점이 있다. 그러나 효모에서 합성된 완성 형태의 당쇄 구조는 포유동물과 같은 표적 생물의 당쇄 구조와 상이해서 동물세포 안에서 면역반응을 유발할 수 있다. 그리고 고 만노스 타입의 효모 특이적 당외쇄 당화에 의한 과당화는 재조합 단백질 산물의 이질성을 초래하여 단백질 정제과정을 복잡하게 하거나 곤란하게 할 뿐만 아니라 카보하이드레이트의 증가로 인해 효소의 특이적 활성을 감소시킨다(Bekkers et al., Biochem. Biophys. Acta. 1089, 345-351, 1991).

<14>      상기 문제점을 해결하기 위하여 포유류 유래의 것과 동등한 생물활성을 가진 당단백질 생산할 수 있는 동물세포의 당화 경로를 효모에 도입하고자 하는 당쇄공학의 필요성이 대두되었다.

<15>      전통 효모인 사카로마이세스 세레비지애(

*Saccharomyces cerevisiae*)에서 발현되는 재조합 당단백질들의 경우 종종 핵심당쇄(core oligosaccharide)에 50개에서 200개의 만노즈(mannose)가 연속적으로 부가되는 과당화(hypermannosylation)와 인체에 항원으로 인지될 수 있는 알파1,3 결합형 말단 만노즈( $\alpha$  1,3-linked terminal mannose) 존재가 당단백질 생산을 위한 숙주로서의 큰 제한점으로 제기되었다(Dean, Biochim. Biophys. Acta., 1426, 309-322, 1999; Ballou, Methods Enzymol., 185, 440-444, (1990)). 반면에 메탄올자화 효모인 한세눌라 폴리모르파와 피키아 파스토리스에서 발현된 재조합 당단백질들은 비록 본래의 단백질에 비해서는 과당화된 상태로 발현되지만 사카로마이세스 세레비지애에서 발현된 재조합 당단백질보다는 전체적인 만노즈 당외쇄(mannose outer chain)의 길이가 상당히 짧다고 보고되었다(Kang et al., Yeast 14, 371-381, 1998; Kim et al., Glycobiology, in press, 2004; Brethauer and Castellino, Biotechnol. Appl. Biochem. 30, 193-200, 1999). 특히, 이를 메탄올자화 효모(methylotrophic yeast)인 한세눌라 폴리모르파와 피키아 파스토리스에서 합성된 당쇄에는 인체에서 면역성을 유발하는 알파1,3 결합형 말단 만노즈( $\alpha$  1,3-linked terminal mannose)가 존재하지 않는다는 점(Kim et al., Glycobiology, in press, 2004; Montesino et al., Protein Expr. Purif. 14, 197-207, 1998)에서 인체 의료용 당단백질 생산 규주로서 전통 효모인 사카로마이세스 세레비지애 보다 월등한 숙주 시스템으로 여겨지고 있다.

<16> 상기 효모들 중에서 사카로마이세스 세레비지애와 피키아 파스토리스를 대상으로 인체형 당쇄를 포함하는 의료용 재조합 당단백질을 생산할 수 있는 숙주 개발을 위한 당쇄공학이 활발히 시도되고 있다(Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304, 1998; Callewaert et al., FEBS Lett., 503, 173-178, 2001; Choi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 100, 5022-5027, 2003; Hamilton et al., Science, 301, 1244-1246, 2003). 사카로마이세스 세레비

지애의 경우, 당외쇄 개시(outer chain initiation)에 중요한 역할을 하는 *OCH1* 유전자 (Nakanishi-Shindo et al., J. Biol. Chem. 268, 26338-26345, 1993; US Patent 5,705,616; US Patent 5,798,226), 면역성을 유발하는 알파1,3 결합형 탈단 만노즈( $\alpha$  1,3-linked terminal mannose) 결합을 매개하는 *MNN1* 유전자(Gopal and Ballou, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8824, (1987); US Patent 5,135,854), 그리고 당쇄에 포스페이트(phosphate)를 첨가시키는 유전자(Jigami and Odani, Biochim. Biophys. Acta., 1426, 335-345, 1999)가 동시에 파쇄되어 핵심당쇄 이후의 당외쇄(outer chain) 합성이 방지된 변이주(*och1Δmn1Δmn4Δ*)에 의해 알파1,2-만노시다제( $\alpha$  1,2-mannosidase)를 소포체에 발현하여 인체 만노즈형(human mannose type)의 *N*-당쇄인  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 를 포함한 중간체들이 부착된 당단백질 합성을 시도하였다(Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304, 1998). 최근 피키아 파스토리스를 대상으로 당외쇄 개시를 담당하는 *OCH1* 유전자가 파쇄된 균주(JP 특허 07145005; JP 특허 07150780; WO 0200856 A2; WO 0200879 A2)에 인체의 당화 경로를 도입하기 위해서 진핵생물 유래의 서로 다른 5개의 효소들을 분비 경로에 도입하여 인체 복합형 *N*-당쇄(complex type *N*-glycan)인  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 가 부착된 재조합 당단백질 생산을 위한 숙주 개발이 보고되었다(Choi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 100, 5022-5027, 2003; Hamilton et al., Science, 301, 1244-1246, 2003). 그러나 이미 간염백신(Janowicz et al., Yeast, 7, 431-443, 1991) 생산을 통해 의료용 재조합 단백질 발현 숙주로 각광받고 있는 메탄올자화 효모인 한세눌라 폴리모르파를 대상으로 인체형 당쇄가 부착된 재조합 당단백질 생산을 위한 당쇄공학의 시도는 현재까지 거의 보고된 바가 없다.

<17> 본 발명자들은 대한민국 특허출원 제2002-37717호를 통하여 한세눌라 폴리모르파의 당외쇄 합성에 중요한 역할을 하는

*OCH1* 유전자를 클로닝하고 이 유전자가 파쇄된 돌연변이주를 이용하여 과당화(hyperglycosylation)가 방지되어 보다 원형 형태와 가까운 당쇄 구조를 지닌 재조합 당단백질을 생산하는 방법을 개발한 바 있다. 하지만 한세눌라 폴리모르파 *OCH1* 유전자가 파쇄된 *Hpoch1Δ* 돌연변이주에서 알파 1,6 만노즈 결합에 의한 당외쇄 개시 반응은 여전히 일어나는 것이 해결해야 할 문제점으로 제기되어, 한세눌라 폴리모르파에서 당외쇄 개시 효소인 알파1,6 만노실트랜스퍼라제(α 1,6-mannosyltransferase)를 암호화하는 유전자를 찾아내어 상기 인체 비친화적인 당화 경로를 차단해야하는 필요성을 느끼게 되었다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<18> 이에 본 발명은 상기 문제점을 개선하여 여러 다양한 외래 유전자의 대량 발현을 위한 숙주 시스템으로 널리 사용되고 있는 고온성 메탄올자화 효모인 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)를 대상으로 인체 유래의 의료용 재조합 당단백질 생산 시스템을 개발하기 위하여, 한세눌라 폴리모르파 게놈 정보를 토대로 신규 유전자 *HpOCH2*를 한세눌라 폴리모르파 DL-1 균주에서 클로닝하여 상기 유전자가 당외쇄 개시 효소인 알파1,6 만노실트랜스퍼라제(α 1,6-mannosyltransferase) 활성을 지님을 규명하고, 상기 유전자가 파쇄된 변이주를 개발하였으며, 상기 돌연변이주가 인체 비친화적인 당화 경로를 차단하며, 상기 변이주에 외래 당쇄 수식 효소들을 발현하여 효모 특이적 N-당쇄 대신에 인체 만노즈형의 N-당쇄인  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 가 부착된 재조합 당단백질을 생산할 수 있다는 것을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

## 【발명의 구성 및 작용】

- <19> 진핵생물에서 단백질의 N-글리코실화는 소포체에서 N-결합형 당쇄( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ )가 초기 단백질(nascent protein)의 적절한 아스파라긴(Asn)에 전달되면서 시작된다.  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 는 ER내의 특정 글루코시다제 및  $\alpha 1,2$ -만노시다제에 의해 3개의 글루코스 잔기가 제거되고 하나의 특정  $\alpha 1,2$ -결합 만노스 잔기가 제거되어 핵심당쇄 구조( $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ )가 된다. 이 핵심당쇄 구조가 골지체로 운반되고 다양한 특이적 효소에 의해 다양한 변형을 거치게 된다. 효모의 경우 골지체 내에서의 당 사슬의 변형은 상이한 만노실트랜스퍼라제에 의한 일련의 만노스 잔기의 추가를 수반한다. 당외쇄 구조는 생물에 따라 특이적인 반응으로 사카로마이세스 세레비지애의 경우 50개 이상의 만노스 잔기를 갖는다.
- <20> 본 발명자는 메탄올자화 효모인 한세눌라 폴리모르파 계놈 정보를 토대로 한세눌라 폴리모르파 DL-1 균주에서 *HpoCH2* 유전자를 클로닝하여 상기 유전자가 당외쇄 개시 효소인 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 활성을 지닌다는 것을 규명하였다. 이렇게 규명된 유전자의 아미노산 서열이 서열번호 2로 기재되었으며, 이의 유전자 서열이 서열번호 1에 기재되어 있다.
- <21> 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 단백질을 코딩하는 DNA 유전자를 제공한다. 또한, 본 발명은 이와 75% 이상의 상동성을 갖고 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 효소 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 DNA 유전자를 제공한다. 바람직하게는, 서열번호 1의 DNA 서열을 갖는 유전자, 이의 유사체 또는 이의 단편을 제공한다.
- <22> 본 발명에서 한세눌라 폴리모르파 기원의 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 유전자에 대해 사용된 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 알파1,6-만노실트랜스퍼라제를 코딩하는 DNA 서열과 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 동일

할 수 있는 DNA 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

<23> 본 발명자는 상기한 유전자를 GeneBank에 기탁번호 AY502025로 기탁하였으며, 또한 이러한 유전자를 포함하는 재조합벡터 pBS-HpOCH2/ 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5@를 2004년 1월 15일에 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, 한국 대전시 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원)에 기탁번호 제KCTC 10583BP호로 기탁하였다.

<24> 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 단백질을 코딩하는 DNA 또는 이와 90% 이상의 상동성을 갖고 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 효소 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 DNA의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 이러한 재조합 벡터는 바람직하게는 서열번호 1로 기재되는 DNA 유전자를 포함한다. 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하며, 바람직하게는 기탁번호 제KCTC 10583BP호로 기탁된 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

<25> 효모로부터 포유류형 당쇄를 가지는 당단백질을 생산하기 위해서는 효모 당외쇄 생합성에 관여하는 효소군의 유전자가 결신된 돌연변이주 사용으로 상기 목적이 달성될 수 있다. 돌연변이주를 얻기 위해서는 약제, 자외선 조사, 자연변이에 의해 유전자 돌연변이를 획득하거나 인위적으로 표적 유전자를 파괴시키는 방법이 있다. 본 발명에서는 당외쇄 개시에 중요한 역할을 하는 알파1,6-만노실트랜스퍼라제를 유전자공학적 방법으로 중합효소 연쇄반응과 세포내 유전자 재조합이라는 두가지 기술을 도입하여 알파1,6-만노실트랜스퍼라제의 유전자(Och2) 파쇄를 시도하였다.

- <26> 본 발명자는 상기한 바와 같이 밝혀진 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 유전자를 결손시킨 한세눌라 폴리모르파  $Hpoch2\Delta$  변이주(한세눌라 폴리모르파 DL-1  $och2\Delta$ )를 제작하여 효모 특유의 연속적인 알파1,6-만노즈 부착 과정이 방지되어 과당화가 현저히 감소된다는 것을 입증하였으며, 이 변이주를 2004년 1월 15일에 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, 한국 대전 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원)에 기탁번호 제KCTC 10584BP호로 기탁하였다.
- <27> 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 기탁번호 제KCTC 10584BP호로 기탁된 한세눌라 폴리모르파  $Hpoch2\Delta$  변이주(한세눌라 폴리모르파 DL-1  $och2\Delta$ )를 제공한다.
- <28> 소포체에서 운반되는 당단백질상의 N-글리칸의 대부분은  $MangGlcNAc_2$  당쇄 구조를 가지며 단백질이 소포체에서 골지체로 운반된 후, 서로 다른 만노실트랜스포라제에 의해서 추가적인 만노스 잔기가 첨가되어 많은 만노스 측쇄를 가지는 당단백질이 만들어 진다. 재조합 당단백질의 과당화가 바람직하지 못하기 때문에, 본 발명에서 제작된 한세눌라 폴리모르파 변이주를 재조합 당단백질을 발현시키기 위한 숙주 세포로 사용하여 당화를 감소시킬 수 있으며, 또한 당쇄 수식에 관련된 효소 활성을 갖는 하나 이상의 단백질을 발현시킬 수 있는 발현 벡터로 상기한 변이주를 형질전환시키는 경우 더욱 효과적으로 과당화를 억제하거나 다른 구조를 지닌 당쇄로 전환시킬 수 있다. 이러한 과당화 감소와 관련된 당쇄 수식 효소로는 알파1,2-만노시다제, 만노시다제 IA, 만노시다제 IB, 만노시다제 IC, 만노시다제 II, N-아세틸글루코자미닐트랜스퍼라제 I, N-아세틸글루코자미닐트랜스퍼라제 II, 갈락토실트랜스퍼라제, 사이알릴트랜스퍼라제, 퓨코실트랜스퍼라제 등이 포함되나, 반드시 이들로만 한정되는 것은 아니고, 재조합 당단백질의 과당화 감소 및 변형에 일조할 수 있는 다양한 유전자를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체예에서는 한세눌라 폴리모르파  $Hpoch2\Delta$  변이주에서 알파1,2-만노시다제를 발현시켜 효모형 N-당쇄 형성이 방지되고 인체형 N-당쇄로 변형된 재조합 당단백질을 생성하였다. a

-1,2-만노시다제는  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 의 비활원 말단의  $\alpha$ -1,2-결합 만노스 잔기를 절단하고, 이러한 당단백질 상의 핵심당쇄를  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로 변환시킨다.  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 의 경우 골지 만노실트랜스 페라제에 대하여 열등한 기질로 작용하여 감소된 만노스 함량을 갖는 당단백질을 생산할 수 있다. 상기한 형질전환에 사용되는 발현 벡터에 포함되는 당쇄 수식 효소 유전자는 이러한 효소들을 코딩하는 전체 유전자 서열만이 아니라 이들의 기능성 부분을 코딩하는 단편 서열도 가능하다. 발현 벡터는 통합성(integrative) 또는 유도성(inductive) 프로모터, 및 3' 종결 서열을 포함하며, 통합성(integrative) 또는 복제성(replicative) 벡터일 수 있다.

<29> 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 당쇄 수식 효소의 발현 벡터를 추가로 포함하는 한세눌라 폴리모르파 변이주를 제공한다. 바람직하게는 당쇄 수식 효소는 알파 1, 2-만노시다제, 만노시다제 IA, 만노시다제 IB, 만노시다제 IC, 만노시다제 II, N-아세틸글루코자미닐트랜스페라제 I, N-아세틸글루코자미닐트랜스페라제 II, 갈락토실트랜스페라제, 사이알릴트랜스페라제, 퓨코실트랜스페라제 등로 이루어진 그룹중에서 선택된다.

<30> 또 다른 양태로서, 본 발명은 기탁번호 제KCTC 10584BP호로 기탁된 한세눌라 폴리모르파 변이주를 사용하여 당화가 감소된 재조합 당단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

<31> 상기한 바와 같은 본 발명의 방법에 따라 효모형 N-당쇄 형성이 방지되고 인체형 N-당쇄로 변형된 재조합 당단백질을 생산할 수 있다.

<32> 본 명세서에서 용어 "당단백질(glycoprotein)"이란 메틸요구성 효모 균주, 특히 한세눌라 폴리모르파에서 발현될 때 하나 이상의 아스파라긴 잔기 또는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기 상에서 당화되거나 아스파라긴 및 세린 또는 트레오닌 잔기상에서 당화된 단백질을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "당화가 감소된(reduced glycosylation)"이란 메틸요구성 효모

균주내에서 당단백질이 발현될 때 변형되지 않은 야생형의 메틸요구성 효모와 비교하여 당단백질상에서의 탄수화물 부분의 감소된 크기, 특히 보다 적은 만노즈 잔기를 갖는 것을 의미한다.

<33> 상기한 방법에서 한세눌라 폴리모르파 *Hpcho2Δ* 변이주에 도입되는 당단백질 발현 벡터는 당단백질의 발현을 위한 뉴클레오파이드와 함께 알파1,2-만노시다제 등과 같은 당쇄 수식효소를 발현하는 것이 바람직하다.

<34> 생산된 당단백질은 통상적인 방법에 의해 정제될 수 있으며, 정제될 특정 단백질의 특성에 따라 정제 프로토콜을 결정한다. 이러한 결정은 당업자에게 통상적인 기술에 속한다. 예를 들어 침전, 면역흡착, 분획화 또는 다양한 크로마토그래피와 같은 전형적인 분리 기술에 의해 정제할 수 있다.

<35> 본 발명에 따라 생산될 수 있는 당단백질은, 예를 들어 사이토킨(예: 인터페론- $\alpha$ , 인터페론- $\beta$ , 인터페론- $\gamma$ , G-CSF 등), 응집인자(예: VIII 인자, IX 인자, 인간 단백질 C), 내피성장인자, 성장호르몬 방출인자, 페니실리움 미니오투테움 텍스트라네이즈(dextranase), 바실러스 아밀로리퀴파시엔스  $\alpha$ -아밀라제(*Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase), 사카로마이세스 세레비지애 아스파틱 프로테아제(aspartic protease), 사카로마이세스 세레비지애 인버타제, 티파노소마 크루지 트랜스-시알리다제(*Typanosoma cruzi* trans-sialidase), HIV 외피 단백질(HIV envelope protein), 인플루엔자 바이러스 A 헤마글루티닌(influenza virus A haemagglutinin), 인플루엔자 뉴라미니다제(influenza neuraminidase), 소의 엔테로카이네이즈(enterokinase) 활성인자, 소의 포진 바이러스 타입-1 당단백질 D(Bovine herpes virus type-1 glycoprotein D), 인간 안지오스타틴(human angiostatin), 인간 B7-1, B7-2 및 B-7 수용체 CTLA-4, 인간 조직 인자(human tissue factor), 성장 인자(예: 혈소판-유래 성장 인자), 인간  $\alpha$ -앤티트립신(human  $\alpha$ -antitrypsin), 인간 에리트로포이에틴, 조직 플라

즈미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator), 플라즈미노겐 활성화인자 억제인자-1(plasminogen activator inhibitor-1), 우로키나제(urokinase),  $\alpha$ -갈락토시다제( $\alpha$ -galactosidase), 플라즈미노겐, 트롬빈, 면역글로불린 등을 포함한다.

<36> 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 방법으로 생산된 당단백질을 제공한다.

<37> 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적일 뿐 본 발명의 권리 범위는 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<38> 실시예 1:

<39> 한세눌라 폴리모르파 *HpOCH2* 유전자 확보 및 아미노산 서열 분석

<40> 최근에 완성된 한세눌라 폴리모르파 RB11 균주에 대한 유전체 염기서열 정보(Ramezani-Rad et al., FEMS Yeast Res., 4, 207-215 (2003))로부터 사카로마이세스 세레비지 애의 당외쇄 생합성 관련 *OCH1* 유전자군 (gene family)과 높은 유사성을 보이는 ORF(open reading frame)들의 전체 염기서열 정보를 얻을 수 있었다. 도 9는 사카로마이세스 세레비지 애와 한세눌라 폴리모르파 Och1 단백질 상동체들 사이의 아미노산 서열 동일성(identity)과 유사성(similarity)을 나타낸다. 도 9에서 ORF168과 ScOch1p 아미노산 서열 사이의 동일성과 유사성을 굵은 글씨와 음영으로 표시하였다.

<41> 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지애의 당외쇄 생합성 초기 단계의 알파 1,6-만노즈 부착 과정에 중요한 역할을 하는 사카로마이세스 세레비지애

*OCH1* 유전자(*ScOCH1*)(Jungman and Munro, *Embo J.* 17, 423 (1998))와 40% 아미노산 서열 동일성과 54% 아미노산 서열 유사성을 보이는 ORF168 유전자의 기능분석을 위해 한세눌라 폴리모르파 DL-1 군주(Levine and Cooney, *Appl. Microbiol.*, 26, 982-990, (1973))에서 추출한 DNA를 주형으로 한 쌍의 프라이머(168Not-N과 168Not-C; 표 1)를 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통해 ORF168이 포함된 1.35 kb 크기의 DNA 절편을 확보하고 아미노산 서열을 분석하였다.

<42> 본 발명자들의 선행 발명(대한민국 특허 출원 번호 2002-37717)에서 확보된 한세눌라 폴리모르파 유전자는 사카로마이세스 세례비지애 *OCH1* 유전자와 22%와 36%의 아미노산 서열 동일성과 유사성을 나타내어 이 유전자를 *HpOCH1*으로 명명하였기에 본 발명에서 분석된 ORF168을 *HpOCH2*로 명명하고 유전자의 염기서열을 AY502025로 GenBank에 기록하였다. *HpOCH2*는 1287 bp 크기로 428개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화한다고 예상된다. 상기 HpOch2 단백질의 29번째에서 51번째 아미노산 서열에는 하나의 막 통과 부위(transmembrane spanning region)로 예측되는 부분이 있어서 대부분의 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase)들이 해당되는 type II 막단백질(membrane protein)로 사료된다(도 1). 그리고 글리코실트랜스퍼라제들의 활성 부위로 알려진 DXD 요소(Lussier et al., *J. Cell. Biol.*, 131, 913-927, (1995))가 관찰되어 HpOch2 단백질이 글리코실트랜스퍼라제 활성을 지닐 것으로 예상되었다(도 1). HpOch2 단백질의 아미노산 서열은 사카로마이세스 세례비지애 *OCH1* 유전자 산물을 비롯하여 여러 다른 효모인 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*; Thomas et al., unpublished results, GenBank accession number AY064420), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*; Japanese Patent 07145005), 쇠조사카로마이세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*; Yoko-o et al., *FEBS Lett.*, 489, 75-80, (2001))의 *OCH1* 유전자 산물과 비교적 높은 유사성을 보였다(도 2).

<43> 실시예 2:

<44> 한세눌라 폴리모르파 *HpOCH2* 유전자 결손 균주 제작 및 특성 분석

<45> 한세눌라 폴리모르파 *OCH2* 유전자가 파쇄된 변이주를 제작하기 위해 표 1에 기술된 프라이머(*HpOCH2* 유전자 클로닝과 파쇄를 위한 중합효소 연쇄반응에 사용된 프라이머들)들을 사용하여 융합 중합효소 연쇄반응(fusion PCR)과 세포내 유전자 재조합(*in vivo* DNA recombination)이라는 두 가지의 기술을 도입하여 유전자 파쇄를 시도하였다(Oldenburg et al., Nucleic Acid Res., 25, 451, (1997)). 일차 PCR에 의해서 각각의 *URA3* 유전자와 *HpOCH2* 유전자의 N-말단과 C-말단을 확보한 후 이차 융합 중합효소 연쇄반응에 의해서 *HpOCH2* 유전자의 N-말단과 *URA3* 유전자의 N-말단을 연결시키고 *URA3* 유전자의 C-말단과 *HpOCH2* 유전자의 C-말단을 연결하였다. 이와 같이 확보한 각각의 DNA 조각 두개를 효모 세포내로 도입한 후 세포내 유전자 재조합에 의해서 *HpOCH2* 유전자가 파쇄된 형질전환체를 선별하였다(도 3). 일차적으로 *URA3* 선별 표지로 유라실(uracil)이 결핍된 최소배지에서 자라는 형질전환체들을 골라낸 후 중합효소 연쇄반응에 의해서 야생형 균주와 다르게 증폭된 DNA 조각을 확인하여 *HpOCH2* 유전자가 파쇄된 한세눌라 폴리모르파 변이주인 *Hpoch2Δ (leu2 och1::URA3)* 균주를 제작하였다. 상기 확보한 *Hpoch2Δ* 균주의 성장 특성을 살펴보았을 때, *Hpoch2Δ* 균주는 *Hpoch1Δ* 균주(KCTC 10264BP)와 같이 45°C에 대한 온도 민감성을 나타냈으나 *Hpoch1Δ*와는 다르게 37°C에서의 성장 속도는 야생형 균주와 별 차이가 없음을 볼 수 있었다. 그리고 하이그로마이신 B(hygromycin B)의 첨가에 의해서 그 성장이 심하게 저해되고 소듐 데옥시콜레이트(Sodium deoxycholate)에 대한 약간의 민감성을 보이는 특성을 가지고 있었다(도 4). 이러한 특성은

효모에서 당외쇄 합성이 결손된 돌연변이주에서 나타내는 공통적인 특징으로서 한세놀라 폴리모르파 *hpoch2Δ* 균주는 당외쇄 생합성 과정에 결함이 있음을 시사하고 있다.

&lt;46&gt; 【표 1】

| Primer   | Sequences   |
|----------|---|
| 16SNot-N | 5'-AAGGAAAAAAAGCGGCCGCCGGTGAAGAACGGTAT-3'                           |
| 16SNot-C | 5'-TTTCCTTGCAGCCGCCCTCTGTGCCTGCTCATGAT-3'                           |
| UNfor    | 5'-GGATCCCCGGGTACCGAGCT-3 <sup>a</sup>                              |
| UNrev    | 5'-CACCGGTAGCTAATGATCCC-3'  |
| UCfor    | 5'-CGAACATCCAAGTGGGCCG-3'   |
| UCrev    | 5'- <u>CTGGCGAAAGGGGGATGTGC</u> -3 <sup>b</sup>                     |
| 16SNfor  | 5'-GGCGGATATGGGGCTTCGCC-3'  |
| 16SNrev  | 5'- <u>AGCTCGGTACCCGGGGATCC</u> CGTTCCAGGGCTCCACGTCC-3 <sup>c</sup> |
| 16SCfor  | 5'- <u>GCACATCCCCCTTCGCCAG</u> CCGATCACGAGCTTCAGTCC-3 <sup>d</sup>  |
| 16SCrev  | 5'-CGTCGTCCGGGCCAGTTCG-3'   |

&lt;47&gt; 실시 예 3:

<48> 한세놀라 폴리모르파 *Hpoch2Δ* 결손 변이주로부터 합성된 당쇄의 크기 및 구조 분석

&lt;49&gt; 상기 실시예 2에서 개발된 한세놀라 폴리모르파

*Hpoch2Δ* 변이주에서 합성되는 당쇄의 크기와 구조에 대해서 분석하기 위해서 아스페질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래의 당단백질인 글루코우즈 옥시다제(glucose oxidase; GOD)를 한세눌라 폴리모르파 야생형 균주와 *Hpoch2Δ* 변이주에서 분비 발현하였다. 당단백질인 GOD에는 N-결합형 당화가 일어날 수 있는 8개의 아미노산 서열이 존재한다(Frederick et al., J. Biol. Chem., 265, 3793 (1990)). 6개의 히스티딘(histidine)이 말단에 부착된 GOD를 발현하는 벡터 pDLMOX-GOD(H)(Kim et al., Glycobiology, (2004))로 형질 전환된 한세눌라 폴리모르파 야생형 균주와 *Hpoch2Δ* 결손 균주를 메탄올이 2% 첨가된 YPM (1% yeast extract, 2% peptone, 2% methanol) 배지에서 배양하여 GOD를 분비 발현하였다. 배양액으로 분비된 GOD를 니켈 컬럼(nickel column)을 통과시켜 C-말단 부분에 6개의 히스티딘이 존재하는 GOD만을 선택적으로 분리하고 GOD에 부착되어 있는 당쇄를 떼어내기 위해서 피엔지에이지 에프(PNGase F)를 처리한 뒤, 형광물질인 2-아미노피리딘(2-aminopyridine, PA)으로 표지하여 HPLC로 분석하였다. 도 5의 A와 D에서 볼 수 있듯이 8개에서 12개의 만노즈가 부착된 당쇄가 골고루 분포되어 있는 야생형 균주에 비해서 *Hpoch2Δ* 결손 균주에서 분비 발현된 GOD에 부착되어 있는 당쇄는 대부분이 만노즈 8개가 부착된 핵심당쇄가 주된 형태로 관찰되었다. 이는 *Hpoch2Δ* 변이주에서 만노즈 8개 이후의 당외쇄 생합성이 현저하게 저해됨을 시사하고 있다. GOD에서 분리된 당쇄에 알파1,2-만노시다제와 알파1,6-만노시다제를 순차적으로 처리한 후 당쇄 프로파일의 변화를 분석한 결과, 야생형 균주에서 확보된 당쇄는 만노즈 5개와 6개에 해당하는 당쇄로 전환된 후 알파1,6-만노시다제 처리에 의해서 모두 만노즈 5개 당쇄로 전환된 반면에, *Hpoch2Δ* 변이주의 당쇄는 알파1,2-만노시다제 처리만으로 모두 만노즈 5개에 해당하는 당쇄로 전환되었다(도 5). 상기 결과는 *Hpoch2Δ* 변이주에서 알파1,6-만노즈 결합에 의한 당외쇄 신장 개시 합성이 전혀

일어나지 않음을 보여주어 *HpOCH2* 유전자 산물이 알파1,6-만노실트랜스퍼라제의 활성에 직접적으로 또는 간접적으로 관여함을 시사한다.

<50> 실시 예 4:

<51> 한세놀라 폴리모르파 *HpOCH2* 단백질의 기능 분석

<52> 한세놀라 폴리모르파

*HpOCH2* 유전자 산물이 당외쇄 합성 개시과정에서 핵심당쇄에 알파1,6 만노즈를 부착하는 사카로마이세스 세레비지애 *Och1* 단백질의 기능적 상동체인지를 조사하기 위해, 사카로마이세스 세레비지애 *OCH1* 유전자가 파쇄된 변이주(*Scoch1Δ*)에 *HpOCH2* 유전자 발현벡터(YEp352GAPII-*HpOCH2*)를 도입하여 *Scoch1Δ* 돌연변이의 열민감성 극복여부를 관찰하였다(도 6A). 사카로마이세스 세래비시애 발현벡터인 YEp352(Hill et al., Yeast, 2, 163-167, (1986))에 도입된 글리설알데하이드-3-포스페이트 디하이드지나제(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAP)의 프로모터와 터미네이터 사이에 *HpOCH2* 유전자를 비롯하여 *HpOCH1* 유전자와 *ScOCH1* 유전자를 각각 삽입하여 발현벡터(YEp352GAPII-*HpOCH2*, YEp352GAPII-*HpOCH1*, 그리고 YEp352GAPII-*ScOCH1*)를 제작하였다. *HpOCH2* 유전자 발현벡터(YEp352GAPII-*HpOCH2*)가 도입된 사카로마이세스 세레비지애 *Scoch1Δ* 변이주는 높은 온도에서 성장을 회복한 반면, *HpOCH2* 와 유사성을 보이는 *HpOCH1* 유전자 발현벡터(YEp352GAPII-*HpOCH1*)가 *Scoch1Δ* 돌연변이에 도입된 경우에는 열민감성을 극복시키지 못하는 것을 알 수 있었다(도 6A). 그리고 *Scoch1Δ* 돌연변이주가 보이는 또 다른 특징인 당단백질의 과당화 결손이 *HpOCH2* 발현벡터 도입에 의해서 보완되는지 분석한 결과, 도 6B에서 볼 수 있듯이 당단백질인 인버타제(invertase)의 당화정도가 사카로마이세스 세레비지애 *OCH1* 발현벡터(YEp352GAPII-*ScOCH1*)가 도입된 경우와 동일한 수준으로 회복되는 것이 관찰되었다. 이에 반해 *HpOCH1* 유전자가 도입된 경우에는 인버타제(invertase)의 당화정도에 변화가 없었다. 이와 같이 한세눌라 폴리모르파 유전자 *HpOCH2* 발현에 의해서 사카로마이세스 세레비시애 *och1Δ* 돌연변이주의 열민감성과 과당화 결손이 회복됨은 *HpOCH2* 유전자 산물은 당외쇄 합성의 첫 단계에서 주요한 역할을 하는 사카로마이세스 세레비지애 *Och1* 단백질과 기능적 상동체임을 입증한다.

<53> 실제로 한세눌라 폴리모르파 HpOch2 단백질이 사카로마이세스 세레비지애 Och1 단백질과 동일하게 핵심당쇄에 알파1,6 만노즈 결합을 매개하는 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 활성을 가지고 있는지 시험관내 활성분석(*in vitro assay*)으로 조사하였다. 사카로마이세스 세레비지애 *OCH1*, *MNN1*, *MNN4* 유전자들이 동시에 파쇄된 돌연변이주(*och1△mnn1△mnn4△*)는 당외쇄합성이 전혀 일어나지 않는다(Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304, (1998)).

상기 *och1△mnn1△mnn4△* 변이주에 한세눌라 폴리모르파 *HpOCH2* 유전자 발현벡터를 도입한 후 세포막 분획(membrane fraction)을 획득하여 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 활성 측정을 위한 효소 원료로 사용하고 핵심 당쇄 구조를 지닌  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 를 기질로 사용하여 반응시킨 후 그 결과물을 HPLC로 분석하였다. *HpOCH2* 유전자가 삽입되지 않은 벡터 YEp352GAPII가 도입된 *och1△mnn1△mnn4△* 변이주의 세포막 분획에서는 기질로 첨가된  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 의 변화가 없는 데 반하여, 한세눌라 폴리모르파 *HpOCH2* 유전자 발현벡터와 사카로마이세스 세레비지애 *OCH1* 유전자 발현벡터가 각각 도입된 *och1△mnn1△mnn4△* 변이주의 세포막 분획에서는  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 에 하나의 만노즈가 첨가된  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 에 해당하는 피크(peak)가 관찰되었다(도 7).

상기 결과들은 한세눌라 폴리모르파 HpOch2 단백질이 사카로마이세스 세레비지애 Och1 단백질과 마찬가지로 당외쇄 신장개시 합성을 담당하는 알파1,6-만노실트랜스퍼라제의 기능을 가지고 있음을 보여준다.

<54> 실시예 5:

<55> 한세눌라 폴리모르파 *Hpoch2△* 결손 균주를 이용한 당쇄공학

<56> 인체 만노즈 형태의 *N*-결합형 당쇄가 부착된 재조합 당단백질을 생산하는 한세눌라 폴리모르파 균주를 제작하기 위해서, 전통효모 사카로마이세스 세레비시애를 대상으로 수행된 선행

연구(Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304, (1998))에서 기술된 바와 같이 당외 쇄 신장 개시 알파1,6-만노실트렌스퍼라제를 암호화하는 한세눌라 폴리모르파 *HpoCH2* 유전자가 파쇄된 *Hpoch2Δ* 변이주에 아스페질러스 사이토이 유래의 알파1,2-만노시다제를 한세눌라 폴리모르파의 소포체에서 발현되도록 한세눌라 폴리모르파용 알파1,2-만노시다제 발현 벡터 pDUMOX-MsdS(HA-HDEL)을 도입하여 당쇄공학적으로 조작된 재조합 균주 *Hpoch2Δ-MsdSp*를 개발하였다. 알파1,2-만노시다제 발현벡터 pDUMOX-MsdS(HA-HDEL)를 제작하기 위해 아스페질러스 사이토이의 알파1,2-만노시다제 유전자가 포함된 플라스미드 pGAMH1(Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304, (1998))을 주형으로 제한효소 *EcoRI*을 포함한 정방향 프라이머 (5'-GGGGAATTCAAAAAATGGTGGTCTTCAGCAA-3)와 발현량 확인을 위한 HA 부위, 소포체 표지 시그널(HDEL)과 제한효소 *NcoI*을 포함한 역방향 프라이머 (5'-GGGCCATGGTCACAATTCATGCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTATGTACTACTCACCCGCAC-3)를 이용한 중합효소 연쇄반응으로 1.5 kb의 아스페질러스 사이토이의 알파1,2-만노시다제 유전자 절편을 증폭하였다. 확보된 아스페질러스 사이토이의 알파1,2-만노시다제 유전자 절편을 제한효소 *Eco RI*과 *NcoI*으로 처리하여 GOD 발현벡터 pDLMOX-GOD(H)(Kim et al.. Glycobiology, in press, (2003))의 GOD와 치환한 뒤, 한세눌라 폴리모르파 *LEU2* 선택마커를 한세눌라 폴리모르파 *URA3* 선택마커로 대체하여 최종적으로 알파1,2-만노시다제 발현벡터 pDUMOX-MsdS(HA-HDEL)를 제작하였다. 한세눌라 폴리모르파에서 아스페질러스 사이토이 알파1,2-만노시다제 발현은 HA에 대한 항체(Sigma)를 사용한 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

<57>         당쇄공학적으로 조작된 한세눌라 폴리모르파 균주 *Hpoch2Δ-MsdSp*가 인체 만노즈형 N-당 쇄를 합성하는지 조사하기 위해서 분비 발현된 GOD에 부착된 당쇄 구조를 관찰하였다. 외래의 알파1,2-만노시다제가 도입된 재조합 야생형 균주

*HpOCH2-MsdSp*에서도 만노즈 8개 이상 크기의 당쇄 양이 급격하게 줄어드는 반면 만노즈 5개와 6개로 구성된 당쇄가 관찰하였다(도 8A와 B). 외래의 알파1,2-만노시다제가 *Hpoch2 $\Delta$*  결손 균주에 도입된 재조합 *Hpoch2 $\Delta$ -MsdSp* 균주 경우에는 재조합 야생형 균주 *HpOCH2-MsdSp*와 비교하여 만노즈 7개 이상 크기의 당쇄 양이 감소함을 나타내었다(도 8B와 E). 상기 재조합 야생형 균주와 *Hpoch2 $\Delta$*  변이주로부터 분리된 당쇄에 알파1,2-만노시다제를 부가적으로 처리하면 -MsdSp 균주의 당쇄는 만노즈 5개와 6개를 지난 당쇄로 전환된 반면에 *Hpoch2 $\Delta$ -MsdSp* 균주의 당쇄는 알파1,2-만노시다제 처리에 의해서 5개의 만노즈로 구성된 당쇄를 전환되었다(도 8C와 F). 상기 결과는 외래 알파1,2-만노시데이즈를 한세눌라 폴리모르파에 도입하는 경우 야생형 균주에서는 한세눌라 폴리모르파 *HpOch2* 단백질에 의해서 여전히 효모 특이적인 알파1,6-만노즈 결합이 형성되고 있음을 시사하여 인체 만노즈형 N-당쇄를 합성하기 위해서는 한세눌라 폴리모르파 *HpOCH2* 유전자의 파쇄가 필수적임을 보여주고 있다. 따라서 본 발명에서 개발된 *HpOCH2* 유전자가 결손된 *hpoch2 $\Delta$*  변이주는 인체형 당쇄가 부착된 의료용 재조합 당단백질 생산을 위한 숙주로 유용하게 사용될 것이다. 또한 여러 당쇄 수식 관련 효소들을 *Hpoch2 $\Delta$*  변이주에 발현시킴으로써 인체에 면역성을 유발하지 않는 다양한 당쇄구조를 지녀 생리활성이 증가된 신규 당단백질을 생산하는 숙주 개발을 위한 당쇄공학에 매우 유용한 균주로 이용될 것으로 사료된다.

### 【발명의 효과】

<58> 한세눌라 폴리모르파는 재조합 간염 백신 대량 생산 숙주 시스템으로 이미 국제적으로 인정받고 있어 추후 한세눌라 폴리모르파에서 발현된 재조합 단백질들이 생물 의약품으로 개발될 전망이 매우 높다. 이상 상기 실시예들을 통하여 살펴본 바와 같이, 본 발명에서 개발된

한세눌라 폴리모르파 *HpoCH2* 유전자가 결손된 *Hpoch2Δ* 변이주는 당외쇄 신장 개시 과정이 방지됨으로 인해 효모 특유의 연속적인 알파1,6-만노즈 부착이 방지되므로 상기 변이주를 이용하여 분비 경로를 거치면서 당쇄가 부착되는 당단백질을 생산할 경우에 야생형 균주에 비해서 인체형 당단백질에 부착된 당쇄 구조와 보다 가까운 형태로 당단백질을 생산하는 숙주로 이용될 수 있다. 그리고 상기 기술한 바와 같이 *Hpoch2Δ* 변이주를 토대로 당쇄공학에 의해서 제작된 한세눌라 폴리모르파 균주들은 의료용 재조합 당단백질 대량생산을 위한 숙주로 사용될 수 있는 의약 산업상의 매우 유용한 발명인 것이다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

서열번호 2로 기재되는 단백질을 코딩하는 DNA 또는 이와 90% 이상의 상동성을 갖고 알파1,6-만노실트랜스퍼라제(  $\alpha$  1,6-mannosyltransferase) 효소 활성을 나타내는 단백질을 코딩하는 DNA인 유전자.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, 유전자가 서열번호 1로 기재되는 DNA인 유전자.

**【청구항 3】**

서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상의 상동성을 갖고 알파1,6-만노실트랜스퍼라제 효소 활성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 단백질.

**【청구항 4】**

서열번호 1로 기재되는 DNA 유전자를 포함하는 재조합 벡터(기탁번호 제KCTC 10583BP호).

**【청구항 5】**

기탁번호 제KCTC 10584BP호로 기탁된 한세눌라 폴리모르파 *Hpoch2 $\Delta$*  변이주.

**【청구항 6】**

제5항에 있어서, 당췌 수식 효소의 발현 벡터를 추가로 포함하는 한세눌라 폴리모르파 *Hpoch $\Delta$*  변이주.

**【청구항 7】**

제6항에 있어서, 당쇄 수식 효소가 알파1,2-만노시다제, 만노시다제 IA, 만노시다제 IB, 만노시다제 IC, 만노시다제 II, N-아세틸글루코자마닐트랜스퍼라제 I, N-아세틸글루코자마닐트랜스퍼라제 II, 갈락토실트랜스퍼라제, 사이알릴트랜스퍼라제 및 퓨코실트랜스퍼라제로 이루 어진 그룹중에서 선택되는 한세눌라 폴리모르파  $Hpoch2\Delta$  변이주.

**【청구항 8】**

제5항에 따른 한세눌라 폴리모르파  $Hpoch2\Delta$  변이주를 사용하여 당화가 감소된 재조합 당단백질을 제조하는 방법.

**【청구항 9】**

제8항에 있어서, 한세눌라 폴리모르파  $Hpoch2\Delta$  변이주가 당쇄 수식 효소의 발현 벡터를 추가로 포함하는 방법.

**【청구항 10】**

제8항 또는 제9항에 있어서, 재조합 당단백질이 사이토킨, 응집인자, 내피 성장 인자, 성장 호르몬 방출 인자, 성장 인자, 안지오스타틴, 조직 플라스미노겐 활성인자, 플라스미노겐 활성화 인자 역제인자, 우로키나제, 면역글로불린, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스  $\alpha$ -아밀라제, 사카로마이세스 세레비지애 아스파틱 프로테아제, 사카로마이세스 세레비지애 인버타제, 티파 노소마 크루지 트랜스-시알리다제, HIV 외피 단백질, 헤마글루티닌, 엔테로카이네이즈, 포진 바이러스 타입-1 당단백질 D 및 면역글로불린으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 방법.

**【청구항 11】**

제8항 또는 제9항의 방법에 의해 제조된 당단백질.

1020040006352

출력 일자: 2004/7/23

## 【도면】

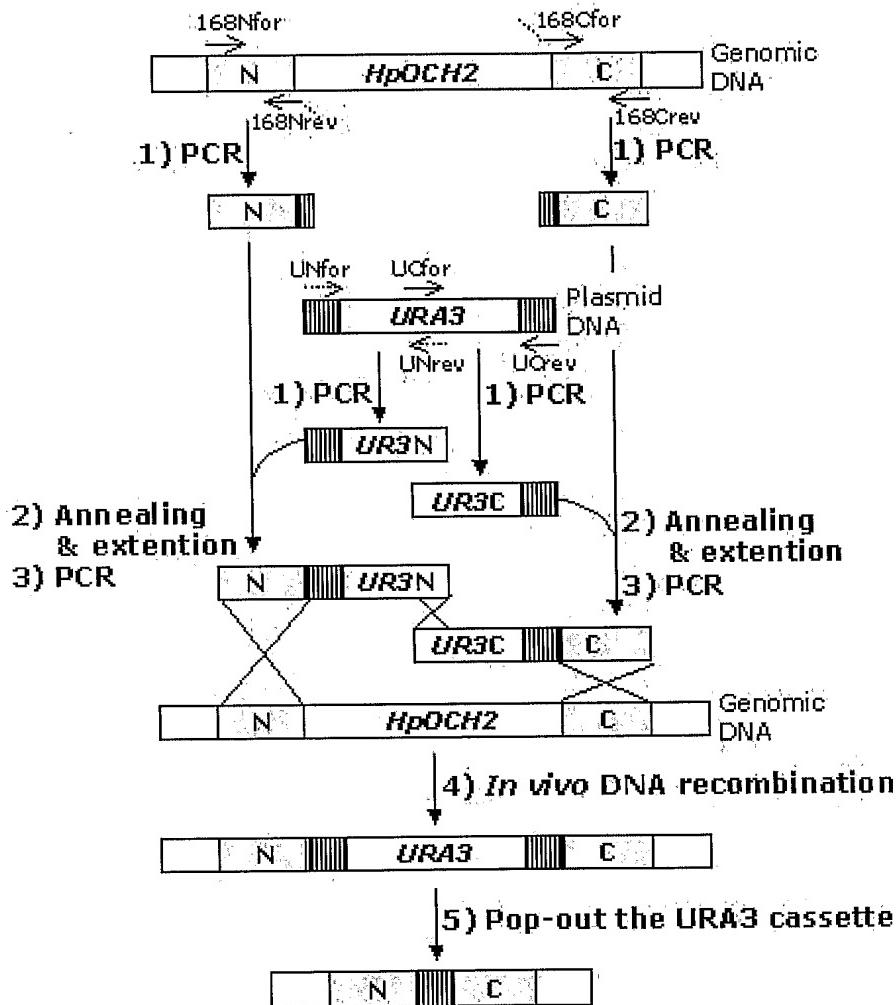
## 【도 1】

-9 cggtgaagaatggtgttatTTTaaattcatgtcaataaccaatgtcccggtgctgaag  
   M V Y F L N F M S I T N V P V L K  
 52 cgcgcgactcacatggcgacgaatcgccgctgggtttcttggtgctgctg  
   R A R L Y M A T N R R L V V V L V V L L  
 112 tactgggtggtccagaacgtttggacgtggagccctggacgcgcgattggccaagtg  
   Y W V V Q N V W T W S P G T R D L A Q V  
 172 gacgcgaagatcgaggccgagctaaactcgaatctacatactttggagcgcattgcgc  
   D A K I E A E L N S N L H T F G A H L R  
 232 cacttaaacccgctccggcagagtcggccaccctgcgtaaaaactcaccttctattc  
   H L N R L P A E S A T L R E K L T F Y F  
 282 ccatattatcctgaaaagcccgtgccgaaccagatctggcagacatggaaaggtcgatctc  
   P Y Y P E K P V P N Q I W Q T W K V D L  
 352 gaagacgacaactccccaaagcagtagacagacggtttcagaagacgtgggtcgagaaaaat  
   E D D N F P K Q Y R R F Q K T W V E K N  
 412 ccagactacgtgtaccacctgattccggactctgtgattgaggactttgtggcagtttg  
   P D Y V Y H L I P D S V I E D F V A S L  
 472 tacgcgaacgtgccggaggtggtcagagcgtaccagctgctccgaaaaatcatgaag  
   Y A N V P E V V R A Y Q L L P K N I M K  
 532 gcggattttccggattttggatctacgcgcgcggaggcacctactcagacatggac  
   A D F F R Y L V I Y A R G G T Y S D M D  
 592 acggtgtttaaagccgatcaaggactggccacggttgcgtacccgctgatccacgct  
   T V C L K P I K D W A T F D R D L I H A  
 652 gccgacaataaggccgatctcccgatagatccagaacgcaagaaccacgcctgtgggg  
   A D N K A D L S Q I D P E A R T T P V G  
 712 ctgggtattggcattggacggccgacccggacaggccgactggcacgactgggttctcgcc  
   L V I G I E A D P D R P D W H E W F S R  
 772 agactgcagttctgcgcgtggacgtccaggcgaagccggacaccgcgtctgcgcgag  
   R L Q F C Q W T I Q A K P G H P L L R E  
 832 ctgatcatccggatcgtggaggagacgttccgcaaacagcacatggcgtttaaaaga  
   L I I R I V E E T F R K Q H M G V L K R  
 892 gtggaggcaaggactcggcgcagatcatgcgtggacaggacccggatattaca  
   V E G K D S G A D I M Q W T G P G I F T  
 952 gacactctgtttgattatctgaacaatgtggcgagcgcacggcaagtggcgacgggtac  
   D T L F D Y L N N V A S D G K L G D G Y  
 1012 ggcgtgggtcggttattggcgcaagcacggcaaatataagctgaaaaagacagaaatt  
   G V G S L Y W R K H G K Y K L K K T E I  
 1072 aacaagaataacgagccattgcattctgaggaccagcttatcaactggaggtcgctgacc  
   N K N N E P L H S E D Q L I N W R S L T  
 1132 aacatggacaagccaaagatcatggggacgtaatgggttaccaatcacgagcttagt  
   N M D K P K I M G D V M V L P I T S F S  
 1192 ccgaacgtgggcacatggctcaaagacgcacgttcagataggctggcattgtggagcat  
   P N V G H M G S K S S S D R L A F V E H  
 1252 ttatTTTctggcagctggaaAGCCAAAAACAAATAGGAAAAATAATTAGCTGCATT  
   L F S G S W K P K N K -  
 1312 ttagataattctcatgagcaggcacagaacg

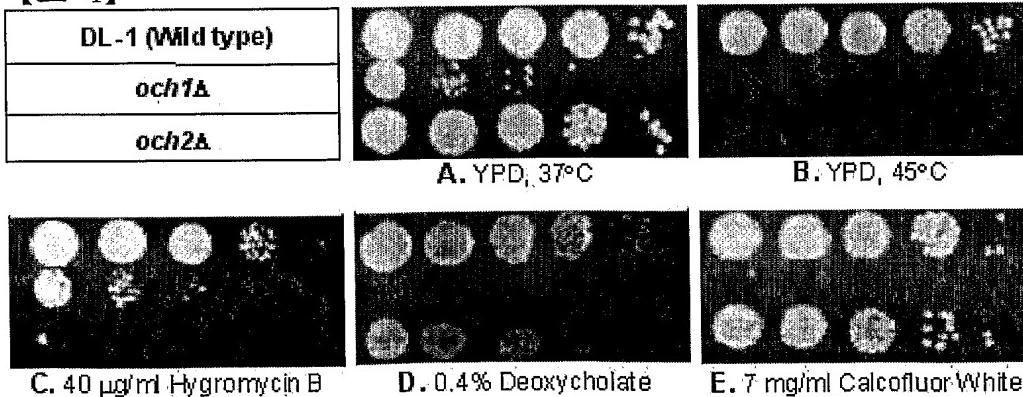
## 【도 2】

|         |     |   |
|---------|-----|---|
| HpOch2p | 1   | -MIVYFLNFMSITNVPVILKARAYMATNRRLVVVLUWVYWW-                                  |
| HpOchlp | 1   | -MSKASPYRGINSSTSPTKKLSEHAGLL-   |
| CaOchlp | 1   | -MLQLREPQMVHKHILKLAVLGIVWIFTTYRHSISL-                                       |
| PpOchlp | 1   | -MAKADGSLLIYYPHNPERRYFYALIAAU-  |
| ScOchlp | 1   | -MSRKLSHLATRSKTKIVVTWVHYSLL-  |
| SpOchlp | 1   | -MLRLRLPSIVIGAATAGSILLFNHGSIEGHEDLTIESMLKDYDPAANKDYVGQQREKEEHDYDQP-         |
| HpOch2p | 42  | QNIWTWSPGTIRDLAQVDAKIEARIN--SMLHTFGAHLR--HLNRLPAESATLREKLTEYFPY             |
| HpOchlp | 32  | CLLFLKFSTSTSINTEDKIVSKYIN--NPFYKLMPLPFCRG--ANPDAAVTATMLAKKFPPY              |
| CaOchlp | 35  | SPSTSTHKTETMSPKLOMAREBLRIN--SNWKELGCFNQFQ--MKYKSLPDESTLHQCLEVDFPY           |
| PpOchlp | 30  | WCVCVLYGPSCOLSSPKDYLPLTL--BSLDDLKTLRAP--SOLSPGTIVEDNLIREOLEAHCPY            |
| ScOchlp | 29  | WFLHLSKRLLSMFYPSKDDFKQTLPPTTSHESQDINERKQI--TVNKKRNQLHNLBCLLJAPY             |
| SpOchlp | 67  | SYMEKEEDPDLEAYLSDPEEELKHSLEELDBENNYLHLRLYSFSQLQDFDEKEAVHMIVPDTIEEV          |
| HpOch2p | 100 | Y-PERPHENIQINOTUKIDLEDDNFPCYCIPREQHIVW-BMPDINVYHLIDPDQVIEDRWAISLYAN--VPFVW- |
| HpOchlp | 87  | DNSAIPHRKSKLQWNUKWPSTDPLPDKKELVNKOKNE--IMPYKYNLTDDEILKQTRPLRDKT-WPFW-       |
| CaOchlp | 94  | IK-EKAFKRNINQITWVKCIDEKSKPPTPLKQQLT-DMPDQYIUPKQCDLDEEQQLSQ--WVVA-           |
| PpOchlp | 88  | R-SYRFEPQHIIQUTWKWSPDSSFEDMIDLCGSHUL-QBSPONDDEFKMDPDAAWKIDRHHHEMR--WPEVW-   |
| ScOchlp | 91  | R-SOAHDEORWQOTMKWGADEKRNFDSSCTPQKQUSGSYSPDQVOSLHSDDSIIPKAEKTRAP--WVVA-      |
| SpOchlp | 137 | P-YHALDQLIHOQTSKDP--EDKVMRTRFUR-DEHPSESEAMODDQSKAHWISSEGDSUSKUS-            |
| HpOch2p | 166 | RAYQOLLPKMIKADFFRYLILWARGGYADEDDTIJKLKPTEWDWATEDRDITHAADNK--ADLSQI          |
| HpOchlp | 153 | DETEFLPMPKLIKEDFARYLILFLNCGYADDEDIDLQKPKTTWEDSDPMNGT-                       |
| CaOchlp | 160 | RAYQYMPKSKILKADFFRYLILFARCGGYADMDTILKPKLPSWITENEHIGVKN-                     |
| PpOchlp | 154 | EDKGLLPEKPLKADFFRYLILFARCGGYADMDTILKPKLPSWITENEHIGVKN-                      |
| ScOchlp | 158 | QWQMLLPGMILKADFFRYLILFARCGGYADMDTILKPKLPSWPSQKSWLNNIIDLMKPIPYKNSKPSLL-      |
| SpOchlp | 200 | CAYANMELLPLKADFFRYLILFARCGGYADMDTILKPKLPSWITENEHIGVKN-                      |
| HpOch2p | 228 | DPEARTTPWFLWTCIHLRDPDRDQHPTWQWRRPQOFQWTTQAKPGHPLRLLRELITRIVEFTF-            |
| HpOchlp | 204 | WVWQBEDDADYDQKHEMTBRIQNEQWTFRAKARHPILKPLLELITLTQAKRN-                       |
| CaOchlp | 214 | RSELWVGTEADPDRDQHPTWQWRRPQOFQWTTQAKPGHPLRLLRELITLTDITLT-                    |
| PpOchlp | 208 | NALVIGTREADPDRDQHPTWQWRRPQOFQWTTQAKPGHPLRLLRELITLTDITLT-                    |
| ScOchlp | 228 | SSDEISHQHMLVIGLEADPDRDQHPTWQWRRPQOFQWTTQAKPGHPLRLLRELITLTDITLT-             |
| SpOchlp | 251 | IRHJGTCIADUDRDPDMMTATPRMOCWTTQAKPGHPLRLLRELITLTDITLT-                       |
| HpOch2p | 289 | -HQEMCVLFRWCKDS--EEDIMQWTCGCIIFTDTTFQYGMWASD-                               |
| HpOchlp | 258 | -DKLQDYYEDFEGMDR--CASTDIEVWTCIEVWMTDTIARHMSLPSPTIVDI                        |
| CaOchlp | 268 | -RPHQGQLSKVLGKNE--ECDIMWNTGPGCIFTDTTFQYGMWASD-                              |
| PpOchlp | 262 | -KESCSYLNWVYBKRDR--GSDKEDMTTCGCIIFTDTTFQYGMWASD-                            |
| ScOchlp | 298 | SEMIDPRFEEDYNVNHYBKRDRDKETYHSLELMNNKNDGSDIENWNTGPGCIFTDTTFQYGMWASD-         |
| SpOchlp | 304 | -LHD SKELSKNCES--WBNTCGCIIFTDTTFQYGMWASD-                                   |
| HpOch2p | 331 | --CRICDCYCVGSLYWRKHCKYKLKKTIEKNNNEPLHSKD--QIHNQISLTMDKPKKIECWVNL-           |
| HpOchlp | 307 | DHQRDIAKLYC--PETGECDMISUOFFACRPAWMPDDWVW-                                   |
| CaOchlp | 310 | --PEEFKNNKK--W--ATLIDWELFTGMEQPLIAHDDVVL                                    |
| PpOchlp | 304 | --GHSGQGICAGSAYYIALSIEERDALSPNGENLKEKVPCKYQAQWVLUQEFTRNESEKIMDDELL          |
| ScOchlp | 368 | LINPMJMKNDDEEGSESATTPAKDVMDTILSKSTRKFYKKISFSLOSSNSMDEFEFLKEFVINDDVVL-       |
| SpOchlp | 341 | -FSVENITNLDEEYIACDWTI-  |
| HpOch2p | 392 | PITSESPNVEHMGSAASSSDPNAWHEHLSGSWKPKNK-                                      |
| HpOchlp | 348 | PRASTREDK--ENNCCKYCYWVHFGECSWKNNNCKCEIKPCMGECYEGEDPNEVEELPKNDVSKRDVIP       |
| CaOchlp | 344 | PITSESPDWNQNGARDSHDPNAYRPHLFSGSWKPDKGMPMEMXO--                              |
| PpOchlp | 371 | PITSESPCIGCSAGDLMHHLAYRPHLFSGSWKP-  |
| ScOchlp | 438 | PITSESPDVCQMCAGQSSDDKMLPQHMFSGSWKEDADKNACHK-                                |
| SpOchlp | 362 | PITSESPCIGCSAGDLMHHLAYRPHLFSGSWKP-  |
| HpOch2p |     | 100%  |
| HpOchlp | 413 | GESKDVAPKKLAKRCAYPYTPY 27.3%  |
| CaOchlp |     | 42.3%   |
| PpOchlp |     | 40.0%   |
| ScOchlp |     | 40.4%   |
| SpOchlp |     | 30.8%   |

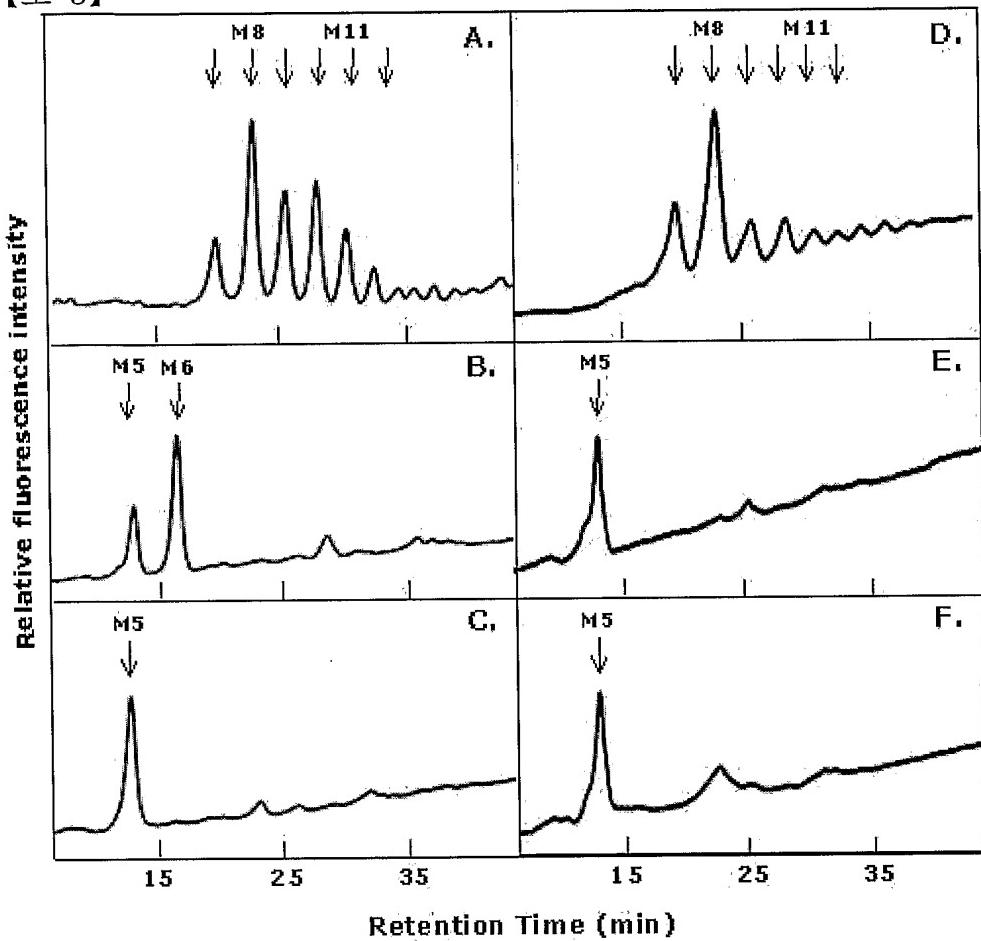
## 【도 3】



## 【도 4】

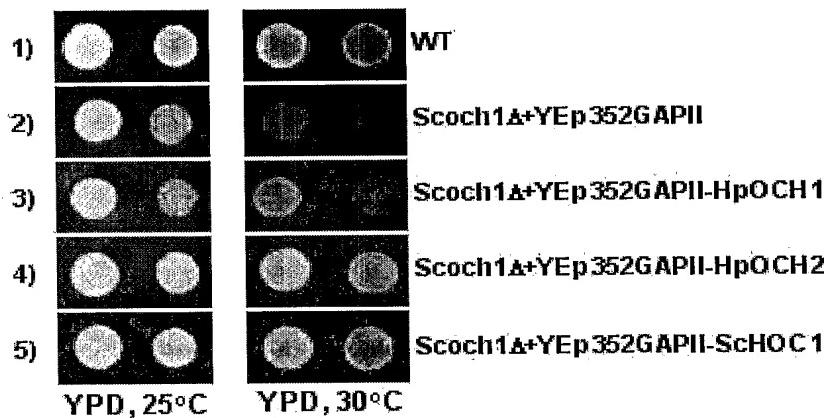


【도 5】

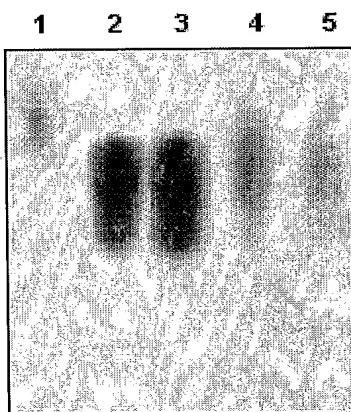


## 【도 6】

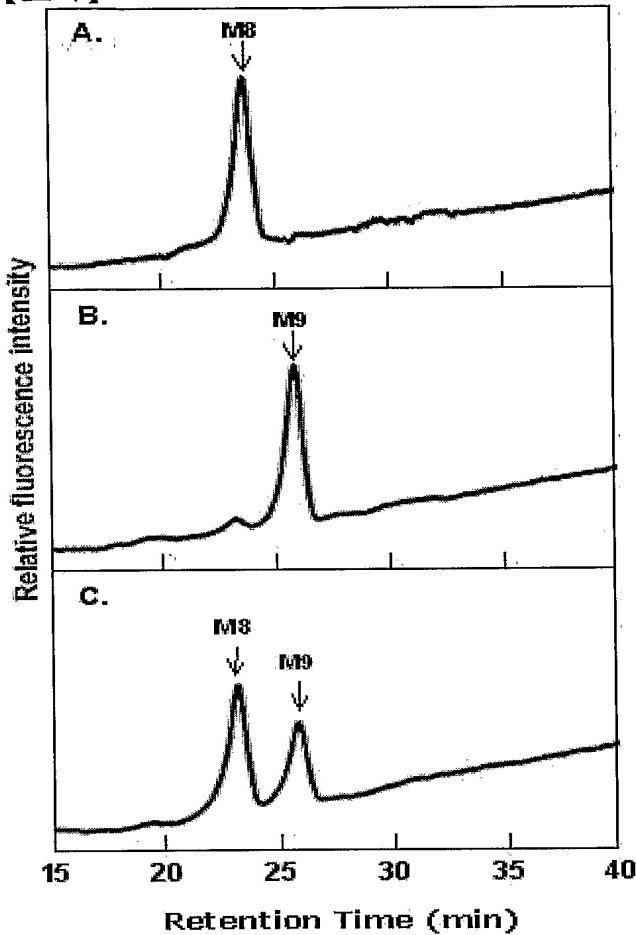
A.



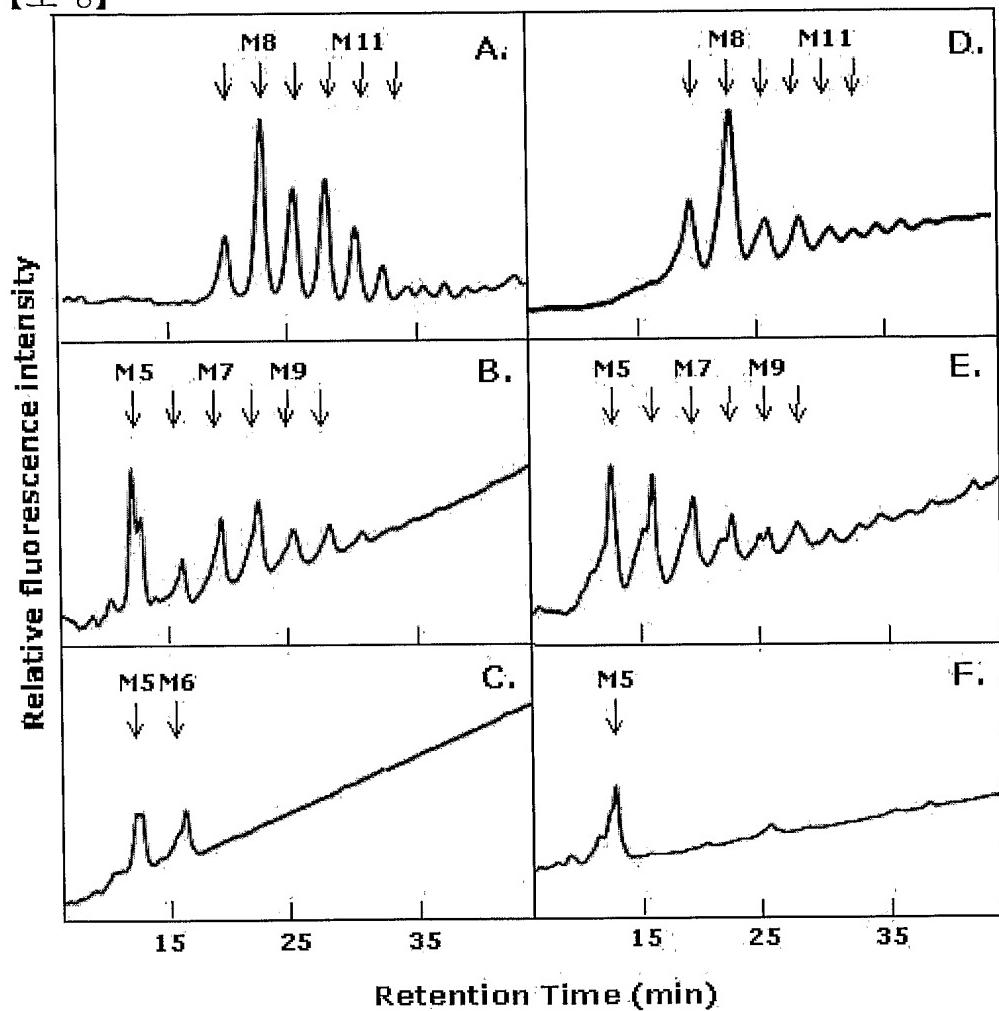
B.



【도 7】



【도 8】



## 【도 9】

|                             | <b>Sch1lp</b> | <b>Stochlp</b> | <b>Mp0chlP</b> | <b>ORF379</b> | <b>ORF168</b> | <b>ORF288</b> | <b>ORF580</b> | <b>ORF100</b> | <b>ORF576</b> |
|-----------------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Sch1lp<br/>(396 aa)</b>  |               | 20             | 21             | 40            | 23            | 18            | 19            | 18            | 17            |
| <b>Stochlp<br/>(480 aa)</b> | 36            |                | 22             | 24            | 37*           | 21            | 18            | 17            | 15            |
| <b>Mp0chlP<br/>(435 aa)</b> | 36            | 36             |                | 19            | 22            | 22            | 32            | 21            | 19            |
| <b>ORF379<br/>(402 aa)</b>  | 63            | 40             | 34             |               | 28            | 18            | 21            | 17            | 16            |
| <b>ORF168<br/>(428 aa)</b>  | 41            | 54*            | 39             | 45            |               | 21            | 21            | 20            | 17            |
| <b>ORF288<br/>(414 aa)</b>  | 35            | 36             | 40             | 34            | 40            |               | 21            | 51            | 33            |
| <b>ORF580<br/>(362 aa)</b>  | 34            | 36             | 48             | 35            | 39            | 40            |               | 20            | 19            |
| <b>ORF100<br/>(425 aa)</b>  | 34            | 33             | 37             | 33            | 36            | 66            | 38            |               | 32            |
| <b>ORF576<br/>(369 aa)</b>  | 30            | 31             | 33             | 30            | 32            | 50            | 33            | 47            |               |

Similarity

## 【서열목록】

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology <120> A novel  
 Hansenula polymorpha gene coding for alpha 1,6 mannosyltransferase and  
 process for the production of recombinant glycoproteins with Hansenula  
 polymorpha mutant strain deficient in the same gene <160> 14 <170>  
 KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 1351 <212> DNA <213> Hansenula polymorpha  
<220> <221> CDS <222> (10)..(1293) <400> 1 cggtaaga atg gtg tat ttt tta  
 aat ttc atg tca ata acc aat gtc ccg 51 Met Val Tyr Phe Leu Asn Phe  
 Met Ser Ile Thr Asn Val Pro 1 5 10

gtg ctg aag cgc gcg cga ctc tac atg gcg acg aat cgc cggtg 99 Val Leu  
 Lys Arg Ala Arg Leu Tyr Met Ala Thr Asn Arg Arg Leu Val 15 20  
 25 30 gtt gtt ctt gtg gtg ctg ctg tac tgg gtg gtc cag aac gtt tgg  
 acg 147 Val Val Leu Val Val Leu Leu Tyr Trp Val Val Gln Asn Val Trp Thr  
 35 40 45 tgg agc cct ggg acg cgc gat ttg gcc  
 caa gtg gac gcg aag atc gag 195 Trp Ser Pro Gly Thr Arg Asp Leu Ala Gln Val  
 Asp Ala Lys Ile Glu 50 55 60  
 gcc gag cta aac tcg aat cta cat act ttt gga gcg cat ttg cgc cac 243 Ala Glu  
 Leu Asn Ser Asn Leu His Thr Phe Gly Ala His Leu Arg His 65  
 70 75 tta aac cgg ctt ccg gca gag tcg gcc acc ctg cgt  
 gaa aaa ctc acc 291 Leu Asn Arg Leu Pro Ala Glu Ser Ala Thr Leu Arg Glu Lys  
 Leu Thr 80 85 90 ttc tat  
 ttc cca tat tat cct gaa aag ccc gtg ccg aac cag atc tgg 339 Phe Tyr Phe Pro  
 Tyr Tyr Pro Glu Lys Pro Val Pro Asn Gln Ile Trp 95 100  
 105 110 cag aca tgg aag gtc gat ctc gaa gac gac aac ttc ccc aag cag  
 tac 387 Gln Thr Trp Lys Val Asp Leu Glu Asp Asp Asn Phe Pro Lys Gln Tyr  
 115 120 125 aga cgg ttt cag aag acg tgg gtc gag  
 aaa aat cca gac tac gtg tac 435 Arg Arg Phe Gln Lys Thr Trp Val Glu Lys Asn  
 Pro Asp Tyr Val Tyr 130 135 140  
 cac ctg att ccg gac tct gtg att gag gac ttt gtg gcg agt ttg tac 483 His Leu  
 Ile Pro Asp Ser Val Ile Glu Asp Phe Val Ala Ser Leu Tyr 145

150                    155                    gcg aac gtg ccg gag gtg gtc aga gcg tac cag ctg  
 ctt ccg aaa aat                    531 Ala Asn Val Pro Glu Val Val Arg Ala Tyr Gln Leu Leu Pro  
 Lys Asn                    160                    165                    170                    atc atg  
 aag gcg gat ttt ttc cgg tat ttg gtg atc tac gcg cgc gga                    579 Ile Met Lys Ala  
 Asp Phe Phe Arg Tyr Leu Val Ile Tyr Ala Arg Gly                    175                    180  
 185                    190                    ggc acc tac tca gac atg gac acg gtg tgt tta aag ccg atc aag  
 gac                    627 Gly Thr Tyr Ser Asp Met Asp Thr Val Cys Leu Lys Pro Ile Lys Asp  
 195                    200                    205                    tgg gcc acg ttt gat cgc gac ctg atc  
 cac gct gcc gac aat aag gcc                    675 Trp Ala Thr Phe Asp Arg Asp Leu Ile His Ala  
 Ala Asp Asn Lys Ala                    210                    215                    220  
 gat ctc tcc cag ata gat cca gaa gca aga acc acg cct gtg ggg ctg                    723 Asp Leu  
 Ser Gln Ile Asp Pro Glu Ala Arg Thr Thr Pro Val Gly Leu                    225  
 230                    235                    gtg att ggc att gag gcc gac ccg gac agg ccc gac  
 tgg cac gag tgg                    771 Val Ile Gly Ile Glu Ala Asp Pro Asp Arg Pro Asp Trp His  
 Glu Trp                    240                    245                    250                    ttc tcg  
 cgc aga ctg cag ttc tgc cag tgg acg atc cag gcg aag ccg                    819 Phe Ser Arg Arg  
 Leu Gln Phe Cys Gln Trp Thr Ile Gln Ala Lys Pro                    255                    260  
 265                    270                    gga cac ccg ctg ctg cgc gag ctg atc atc cgg atc gtg gag gaa  
 acg                    867 Gly His Pro Leu Leu Arg Glu Leu Ile Ile Arg Ile Val Glu Glu Thr  
 275                    280                    285                    ttc cgc aaa cag cac atg ggc gtt tte  
 aaa aga gtg gaa ggc aag gac                    915 Phe Arg Lys Gln His Met Gly Val Leu Lys Arg

|   |  |  |                                     |
|---|--|--|-------------------------------------|
| Val Glu Gly Lys Asp   | 290  | 295  | 300                                 |
| tcg ggc gca gat atc atg cag tgg aca gga ccg ggg ata ttt aca gac |  |  | 963 Ser Gly                         |
| Ala Asp Ile Met Gln Trp Thr Gly Pro Gly Ile Phe Thr Asp         |  |  | 305                                 |
| 310   | 315  | act ctg ttt gat tat ctg aac aat gtg gcg agc gac              |                                     |
| ggc aag ttg ggc   |  | 1011 Thr Leu Phe Asp Tyr Leu Asn Asn Val Ala Ser Asp Gly Lys |                                     |
| Leu Gly   | 320  | 325  | 330                                 |
| tac ggc gtg ggg tcg ttg tat tgg cgc aag cac ggc aaa tat         |  |  | 1059 Asp Gly Tyr Gly                |
| Val Gly Ser Leu Tyr Trp Arg Lys His Gly Lys Tyr                 | 335  |  | 340                                 |
| 345   | 350  | aag ctg aaa aag aca gaa att aac aag aat aac gag cca ttg cat  |                                     |
| tct   | 1107 Lys Leu Lys Lys Thr Glu Ile Asn Lys Asn Asn Glu Pro Leu His Ser |  |                                     |
| 355   | 360  | 365  | gag gac cag ctt atc aac tgg agg tcg |
| ctg acc aac atg gac aag cca                                     |  | 1155 Glu Asp Gln Leu Ile Asn Trp Arg Ser Leu Thr             |                                     |
| Asn Met Asp Lys Pro   | 370  | 375  | 380                                 |
| aag atc atg ggg gac gta atg gtg tta cca atc acg agc ttt agt ccg |  |  | 1203 Lys Ile                        |
| Met Gly Asp Val Met Val Leu Pro Ile Thr Ser Phe Ser Pro         |  |  | 385                                 |
| 390   | 395  | aac gtg ggg cac atg ggc tca aag agc agc tca gat              |                                     |
| agg ctg gca ttt   | 1251 Asn Val Gly His Met Gly Ser Lys Ser Ser Asp Arg Leu             |  |                                     |
| Ala Phe   | 400  | 405  | 410                                 |
| cat tta ttt tct ggc agc tgg aag cca aaa aac aaa                 | taggaaa  |  | gtg gag                             |
| Phe Ser Gly Ser Trp Lys Pro Lys Asn Lys                         |  | 415  | 420                                 |
| 425   | aataaataat tagctgcatt ttagataatt ctcatgagca ggcacagaac g             |  |                                     |

1351 <210> 2 <211> 428 <212> PRT <213> Hansenula polymorpha <400> 2 Met Val Tyr  
 Phe Leu Asn Phe Met Ser Ile Thr Asn Val Pro Val Leu 1 5  
 10 15 Lys Arg Ala Arg Leu Tyr Met Ala Thr Asn Arg Arg Leu Val Val  
 Val 20 25 30 Leu Val Val Leu Leu Tyr  
 Trp Val Val Gln Asn Val Trp Thr Trp Ser 35 40  
 45 Pro Gly Thr Arg Asp Leu Ala Gln Val Asp Ala Lys Ile Glu Ala Glu 50  
 55 60 Leu Asn Ser Asn Leu His Thr Phe Gly Ala His Leu Arg His Leu  
 Asn 65 70 75 80 Arg Leu Pro Ala  
 Glu Ser Ala Thr Leu Arg Glu Lys Leu Thr Phe Tyr 85  
 90 95 Phe Pro Tyr Tyr Pro Glu Lys Pro Val Pro Asn Gln Ile Trp Gln  
 Thr 100 105 110 Trp Lys Val Asp Leu Glu  
 Asp Asp Asn Phe Pro Lys Gln Tyr Arg Arg 115 120  
 125 Phe Gln Lys Thr Trp Val Glu Lys Asn Pro Asp Tyr Val Tyr His Leu 130  
 135 140 Ile Pro Asp Ser Val Ile Glu Asp Phe Val Ala Ser Leu Tyr Ala  
 Asn 145 150 155 160 Val Pro Glu Val  
 Val Arg Ala Tyr Gln Leu Leu Pro Lys Asn Ile Met 165  
 170 175 Lys Ala Asp Phe Phe Arg Tyr Leu Val Ile Tyr Ala Arg Gly Gly  
 Thr 180 185 190 Tyr Ser Asp Met Asp Thr  
 Val Cys Leu Lys Pro Ile Lys Asp Trp Ala 195 200  
 205 Thr Phe Asp Arg Asp Leu Ile His Ala Ala Asp Asn Lys Ala Asp Leu 210  
 215 220 Ser Gln Ile Asp Pro Glu Ala Arg Thr Thr Pro Val Gly Leu Val

|   |   |   |                           |                         |                         |
|---|---|---|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Ile   | 225   | 230   | 235                       | 240                     | Gly Ile Glu Ala         |
| Asp Pro Asp Arg Pro Asp Trp His Glu Trp Phe Ser                               |   |   |                           | 245                     |                         |
| 250   | 255   | Arg Arg Leu Gln Phe Cys Gln Trp Thr Ile Gln Ala Lys Pro Gly |                           |                         |                         |
| His   | 260   | 265   | 270                       | Pro Leu Leu Arg Glu Leu |                         |
| Ile Ile Arg Ile Val Glu Glu Thr Phe Arg                                       |   | 275   | 280                       |                         |                         |
| 285   | Lys Gln His Met Gly Val Leu Lys Arg Val Glu Gly Lys Asp Ser Gly |   | 290                       |                         |                         |
| 295   | 300   | Ala Asp Ile Met Gln Trp Thr Gly Pro Gly Ile Phe Thr Asp Thr |                           |                         |                         |
| Leu   | 305   | 310   | 315                       | 320                     | Phe Asp Tyr Leu         |
| Asn Asn Val Ala Ser Asp Gly Lys Leu Gly Asp Gly                               |   |   | 325                       |                         |                         |
| 330   | 335   | Tyr Gly Val Gly Ser Leu Tyr Trp Arg Lys His Gly Lys Tyr Lys |                           |                         |                         |
| Leu   | 340   | 345   | 350                       | 355                     | Lys Lys Thr Glu Ile Asn |
| Lys Asn Asn Glu Pro Leu His Ser Glu Asp                                       |   |   | 360                       |                         |                         |
| 365   | Gln Leu Ile Asn Trp Arg Ser Leu Thr Asn Met Asp Lys Pro Lys Ile |   | 370                       |                         |                         |
| 375   | 380   | Met Gly Asp Val Met Val Leu Pro Ile Thr Ser Phe Ser Pro Asn |                           |                         |                         |
| Val   | 385   | 390   | 395                       | 400                     | Gly His Met Gly         |
| Ser Lys Ser Ser Ser Asp Arg Leu Ala Phe Val Glu                               |   |   | 405                       |                         |                         |
| 410   | 415   | His Leu Phe Ser Gly Ser Trp Lys Pro Lys Asn Lys             |                           |                         |                         |
| 420   | 425   | <210> 3 <211> 36 <212> DNA <213>                            |                           |                         |                         |
| Artificial Sequence <220> <223> primer 168Not-N <400> 3 aaggaaaaaa gcggccgccc |   |   |                           |                         |                         |
| gtgaagaatg gtgtat   |   |   | 36 <210> 4 <211> 39 <212> |                         |                         |
| DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer 168Not-C <400> 4 tttccttt    |   |   |                           |                         |                         |

gcggccgccc ttctgtgcct gctcatgat 39 <210> 5 <211>  
20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer UNfor <400> 5  
ggatccccgg gtaccgagct 20 <210>  
6 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer UNrev  
<400> 6 caccggtagc taatgatccc  
20 <210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
primer UCfor <400> 7 cgaacatcca agtggggccga  
20 <210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
primer UCrev <400> 8 ctggcgaaag gggatgtgc  
20 <210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
primer 168Nfor <400> 9 ggccggatatg gggcttcgcc  
20 <210> 10 <211> 40 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
primer 168Nrev <400> 10 agctcggtac ccggggatcc cgttccagg ctccacgtcc  
40 <210> 11 <211> 40 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
primer 168Cfor <400> 11 gcacatcccc ctttcgccag ccgatcacga gcttcagtcc  
40 <210> 12 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
primer 168Crev <400> 12 cgtcgtccgg gcccagttcg  
20 <210> 13 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
primer for the amplification of alpha1,2-manosidase in Aspergillus saitoi <  
400> 13 ggggaattca aaaaaatggt ggtttcagc aaa  
33 <210> 14 <211> 69 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

102 10006352

출력 일자: 2004/7/23

primer for the amplification of alpha1,2-manosidase in

Aspergillus saitoi <

400> 14 gggccatggc cacaattcat catgcgcata gtcaggaaca tcgttatgggt atgtactact

60 cacccgcac

69

